

จากนั้นนำไปสกัดน้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำ 3 ซ้ำ โดยใช้วิธีการสกัด 5 วิธี คือ

วิธีที่ 1 การบดแล้วคั้น โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender)

วิธีที่ 2 การต้มแล้วคั้น ใช้อัตราส่วนระหว่างผลมะเกี๋ยงกับน้ำ 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก ต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที

วิธีที่ 3 การบดแล้วเติมเอนไซม์เพคตินเนส 2,000 ppm โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก ปรับ pH 4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่ในน้ำอุ่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เพคตินเนส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีที่ 4 การบดแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก น้ำหนัก ปรับ pH 4 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่ในน้ำอุ่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีที่ 5 การบดแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm ร่วมกับเอนไซม์เพคตินเนส 2,000 ppm โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก ปรับ pH 4 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่ในน้ำอุ่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิลงมาถึง 37 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เพคตินเนส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นในแต่ละวิธี ทำการแยกเอาน้ำมะเกี๋ยงออกโดยการนำไปบีบอัดด้วยเครื่องคั้นแบบไฮดรอลิกและกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น (ตัดแปลงจากสมชาย และคณะ, 2551) แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่างๆ ดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ได้แก่

- ค่าสี โดยการนำน้ำคั้นผลมะเกี๋ยงไปวัดค่าของสีด้วยระบบ $L C h^*$ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ค่าสี Color Quest II Colorimeter (รุ่น CR 300 Series, Japan) (ตัดแปลงจากสมชาย และคณะ, 2551)

- ความเข้มของสี โดยการนำน้ำคั้นผลมะเกี๋ยงไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (OD_{520}) (ตัดแปลงจาก Iland *et al.*, 2000)

- ค่าความหนืด โดยการนำน้ำมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้นไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดความข้นหนืด Brookfield Viscometer (รุ่น LVDV-II, Germany) มีหน่วยเป็นเซนติพอยต์ (cps)

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan) (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยวัดด้วยเครื่อง pH meter (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) โดยการไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic compound) ของน้ำมะเกี๋ยง (ดัดแปลงจาก Waterman and Mole, 1994)
- ปริมาณแทนนิน (AOAC, 2000 และ Atanassova and Christova Bagdassarian, 2009)
- ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanins) ของน้ำมะเกี๋ยง (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005)
- ปริมาณสารเคอร์ซีทิน (ดัดแปลงจาก Fecka and Turek, 2008) วัดเฉพาะวิธีที่ดีที่สุด
- ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Radicals scavenging) ของน้ำมะเกี๋ยงโดยใช้ 3 วิธี คือ Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH Method) (ดัดแปลงจาก Brand-Williams *et al.*, 1995 และ Šircelj *et al.*, 2010)
- Scavenging effect on 2,2- azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS Method) (ดัดแปลงจาก Re *et al.*, 1999) และ
- Ferric reducing Antioxidant Power (FRAP Method) (ดัดแปลงจาก Benzie and Strain, 1996)

จากข้อมูลคุณภาพที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test เลือกวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดน้ำมะเกี๋ยงไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการระเหยน้ำมะเกี๋ยงสกัดโดยเทคนิคการระเหยภายใต้สุญญากาศ นำน้ำมะเกี๋ยงที่สกัดได้จากวิธีการที่เหมาะสมไประเหย โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (vacuum evaporator) โดยแปรระดับอุณหภูมิของเครื่องระเหย 4 ระดับ คือ 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส ที่ความดันคงที่ -0.94 บาร์ ความดันเกจ (Gauge pressure) ทำการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 10 นาที ระเหยน้ำจมน้ำมะเกี๋ยงสกัดมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 2 เท่า ทำซ้ำ 3 ครั้ง วัดอุณหภูมิสุดท้ายและบันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการระเหยน้ำมะเกี๋ยง วางแผนการทดลองแบบสุ่ม

ตลอด (Completely Randomized Design, CRD) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีตามวิธีการในข้อ 2 นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test นอกจากนี้ยังมีการคำนวณต้นทุนการผลิต โดยคำนวณจากต้นทุนวัตถุดิบหลัก ส่วนผสมอื่น และค่าพลังงานไฟฟ้า แล้วบวกเพิ่มอีกร้อยละ 30 เพื่อเป็นค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และค่าการจัดการ (ดัดแปลงจาก สมชาย และคณะ, 2553)

3. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการระเหยน้ำหม่อนสกัดโดยเทคนิคการระเหยภายใต้สุญญากาศ นำน้ำหม่อนสกัดที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพคตินเนส 1,500 ppm ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากสมชาย และคณะ, 2553) ไประเหย โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (vacuum evaporator) โดยแปรระดับอุณหภูมิของเครื่องระเหย 4 ระดับ คือ 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส ที่ความดันคงที่ -0.94 บาร์ ความดันเกจ (Gauge pressure) ทำการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 10 นาที ระเหยน้ำจนน้ำหม่อนสกัดมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 4 เท่า ทำซ้ำ 3 ครั้ง วัดอุณหภูมิสุดท้ายและบันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการระเหยน้ำหม่อน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีในข้อ 2 นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test นอกจากนี้ยังมีการคำนวณต้นทุนการผลิต โดยคำนวณจากต้นทุนวัตถุดิบหลัก ส่วนผสมอื่น และค่าพลังงานไฟฟ้า แล้วบวกเพิ่มอีกร้อยละ 30 เพื่อเป็นค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และค่าการจัดการ (ดัดแปลงจาก สมชาย และคณะ, 2553)

4. การหาสูตรที่เหมาะสมของน้ำมะกึ่งสกัดเข้มข้นผสมน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นพร้อมดื่ม จากวิธีการทำน้ำมะกึ่งสกัดเข้มข้นพร้อมดื่มที่เหมาะสมในขั้นตอนที่ 2 นำน้ำมะกึ่งสกัดเข้มข้นพร้อมดื่มที่ได้ไปปรับปรุงคุณภาพ โดยทำการผสมกับน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นพร้อมดื่ม ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยวิธีการระเหยภายใต้สุญญากาศในขั้นตอนที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ Mixture Design กำหนดให้ในส่วนผสม คือ น้ำมะกึ่งสกัดเข้มข้นร้อยละ 60 - 100 น้ำหม่อนสกัดเข้มข้นร้อยละ 5 - 30 และน้ำตาลร้อยละ 0-10 จากสูตรต่างๆ ที่แผนการทดลองกำหนดให้นำไปผลิตเป็นน้ำผลไม้ผสมเข้มข้น วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีในข้อ 2 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนเป็นกราฟพื้นที่การตอบสนอง และคำนวณหาสูตรหรือสัดส่วนที่เหมาะสมที่ผู้ทดสอบชิมยอมรับ โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คนด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scaling Test (ไพโรจน์, 2535ก) เพื่อประเมินความชอบในลักษณะต่างๆ (ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และรส) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) (ไพโรจน์, 2535ก)

5. ศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม นำน้ำมะกึ่งผสมน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นพร้อมดื่มน้ำในสูตรเหมาะสมจากข้อ 4 บรรจุในขวดแก้วขนาด 45 มิลลิลิตร และปิดฝาให้สนิท นำไปต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดที่เวลาแตกต่างกัน 3 ช่วง คือ 2 4 และ 6 นาที วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) สุ่มตัวอย่างหลังการผลิตทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีการในข้อ 2 และตรวจวิเคราะห์เพิ่ม ได้แก่ การตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมด (total plate count) ยีสต์และรา (yeast and molds) และจุลินทรีย์ก่อโรค คัดแปลงจากวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (2001) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test เลือกเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อ รวมทั้งศึกษาการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 50 คน ด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scaling Test (ไพโรจน์, 2535ก) เพื่อประเมินความชอบในลักษณะต่างๆ (ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และรส) นอกจากนี้ยังมีการคำนวณต้นทุนการผลิต โดยคำนวณจากต้นทุนวัตถุดิบหลัก ส่วนผสมอื่นๆ และค่าพลังงานไฟฟ้า แล้วบวกเพิ่มอีกร้อยละ 30 เพื่อเป็นค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และค่าการจัดการ (คัดแปลงจาก สมชาย และคณะ, 2553)